



(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : C07K 14/52, 1/34, A61K 38/19		(11) Número de publicación internacional: WO 97/12915 (43) Fecha de publicación internacional: 10 de Abril de 1997 (10.04.97)
(21) Solicitud internacional: PCT/MX96/00018 (22) Fecha de la presentación internacional: 2 de Octubre de 1996 (02.10.96) (30) Datos relativos a la prioridad: 954215 5 de Octubre de 1995 (05.10.95) MX (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL [MX/MX]; Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", Avenida Luis Enrique Erro, Colonia Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, México, D.F. 07738 (MX). (72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): ESTRADA PARRA, Sergio Antonio [MX/MX]; Prologación Carpio y Plan de Ayala, Colonia Plutarco Elías Calles, Delegación Miguel Hidalgo, México, D.F. 11340 (MX). PEREZ MORA, Carlos Adolfo [MX/MX]; Prolongación Carpio y Plan de Ayala, Colonia Plutarco Elías Calles, Delegación Miguel Hidalgo, México, D.F. 11340 (MX).		(74) Mandatario: OSORNIO CORRES, Francisco Javier, Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", Avenida Luis Enrique Erro, Colonia Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, México, D.F. 07738 (MX). (81) Estados designados: AT, AU, BR, CA, CH, CN, DE, ES, GB, JP, KP, RU, US, VN, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publicada Con informe de búsqueda internacional. Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.
(54) Title: PROCESS FOR PURIFYING THE TRANSFER FACTOR FROM LEUCOCYTES (54) Título: PROCEDIMIENTO DE PURIFICACION DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA A PARTIR DE LEUCOCITOS (57) Abstract Process for the purification of the transfer factor (oligopeptides from 1000 to 10000 daltons, which have a biological activity), from leucocytes, comprising the following steps: the cells are lysed in sterile conditions, the suspension is clarified through ultrafiltration, the transfer factor is recovered by diafiltration and concentrated by tangential ultrafiltration. The transfer factor is used pharmaceutically as an immune response regulator. (57) Resumen Procedimiento de purificación del Factor de Transferencia (oligopéptidos de 1.000 a 10.000 daltones, que poseen actividad biológica), a partir de leucocitos, que comprende los siguientes pasos: se lisan las células en condiciones estériles, se clarifica la suspensión mediante ultrafiltración, se recupera el Factor de Transferencia por diafiltración y se concentra por ultrafiltración tangencial. El Factor de Transferencia se utiliza farmacéuticamente como regulador de la respuesta inmune.		

que el extracto dealizable leucocitario posee una fracción peptídica y una fracción correspondiente a un ácido nucléico. Burger en 1979, gracias a este cúmulo de información y sus propios trabajos, propone un modelo molecular bastante aproximado.

5

Vandenbark y cols., en 1977, usando filtración por cromatografía en gel aunado a isoelectroenfoque y HPLC, logró purificar parcialmente los oligopéptidos del dialisado de leucocitos humanos lisados. Basado en estos experimentos y, los trabajos de Burger que empleó diversas enzimas proteolíticas en experimentos de sensibilidad al
10 ataque de éstas, propuso una estructura molecular, consistente en un componente peptídico, el cual está asociado a un oligonucleótido que posee un grupo hidroxilio libre en el extremo 3', a través de un enlace fosfodiéster. Kirkpatrick y Rozzo, en 1992, publican en Molecular Immunology, una metodología para la purificación del extracto dializable leucocitario, usando una combinación de cromatografía de afinidad, fase
15 reversa y HPLC, obteniendo el producto el cual fue estudiado por electroforésis en gel de poliacrilamida y SDS, métodos cromatográficos, y lo mas importante comprobando su actividad biológica.

La metodología usada comúnmente para la obtención del Extracto Leucocitario, es por medio del uso de diálisis por bolsa. Este método, sólo es práctico para la producción
20 de lotes pequeños de unidades del extracto leucocitario. Otra limitante es que el manejo de las bolsas de diálisis es un sistema abierto, de fácil contaminación y que por ende causa problemas de pirógenos.

PROCEDIMIENTO DE PURIFICACION DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA A PARTIR DE LEUCOCITOS

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En 1955 Lawrence describió el Factor de Transferencia en un extracto leucocitario obtenido mediante diálisis. Si bien es cierto que no lo pudo aislar como un producto puro, ya que en dicho extracto existía una gran cantidad de pequeñas biomoléculas con alguna actividad biológica, sí pudo establecer la propiedad de transferir la experiencia inmunológica de un donador ante un antígeno en especial a un receptor que no había estado en contacto previo con dicho antígeno. El autor usó como modelo experimental la respuesta de la intraderemorreacción al PPD, en el cual los sujetos negativos a dicha prueba respondían, es decir, se volvían positivos. Dicha actividad biológica se obtenía de productos con un peso molecular menor a 10 kda, lo cual se lograba gracias a la técnica de la diálisis. A pesar del tiempo transcurrido a la fecha, este método sigue siendo empleado por diversos investigadores, quizá, porque sus propósitos estén centrados en la investigación de los efectos del extracto dializable sobre la respuesta inmune, ante diversos padecimientos, en estudios en poblaciones estadísticamente representativas. Sin embargo, algunos autores como el mismo Lawrence en 1956:

Baram y Mosko en 1962; Baram en 1966; Gottlieb en 1973, intentaron purificarlo por cromatografía líquida de baja presión, electroforésis y métodos enzimáticos y lograron

intradérmicas y la dosis se tenía que aplicar distribuida en diversos sitios representando molestias al paciente. Lo anterior, ha sido la experiencia de diversos investigadores, incluyendo a nuestro grupo. Por esa razón fue muy importante desarrollar una metodología de alto rendimiento que permitiera obtener el producto en bajos volúmenes, gracias a la eliminación del exceso de agua.

Antecedentes de otras patentes

Otro método de obtención de este extracto está descrito por Kirdpatrick y Rozzo, el cual se basa en la combinación de cromatografía de afinidad, fase reversa y HPLC, y fue patentado (1991). Goust y Moulias patentaron un método de producción de los
5 productos del extracto leucocitario a partir de estimulación in vitro de líneas celulares linfoblastoides (1977). Warren patentó una presentación farmacéutica a base de un preparado de uso local en crema (1982).

La nueva metodología desarrollada por nosotros permite manejar grandes volúmenes
10 en sistema cerrado, lo que hace posible producir lotes grandes sin riesgo de contaminación y reducir el volumen final obteniendo un preparado inyectable para uso en humanos, con apego a las más estrictas normas de calidad cumpliendo las buenas prácticas de manufactura. El método consiste en un sistema que consta de pasos sucesivos de diafiltración y filtración tangencial a partir de ultracentrifugación para
15 clarificación de la materia prima. Esta Metodología tipo flujo continuo podría emplearse en la producción de hemoderivados biológicos a nivel de escalamiento industrial.

Hasta antes del desarrollo de la metodología llevada a cabo por nosotros, el uso del extracto dializable leucocitario tenía el inconveniente de que el producto obtenido, se
20 manejaba en dosis con grandes volúmenes de líquido los cuales podían ir de 10 a 20 ml, pues un inconveniente en la obtención del extracto mediante diálisis es el bajo rendimiento del producto, lo que lleva finalmente a manejar grandes volúmenes; ésto era un serio problema puesto que la vía de administración era en inyecciones

6. Diafiltración a través de cassette de 10 Kd de corte, lo que permite retener la fracción con actividad biológica del producto.
7. Concentración mediante filtración tangencial o ultrafiltración con cassette de 1 Kd de corte, eliminando grandes volúmenes de agua y quedando concentrada la muestra.
8. Formulación, que consiste en adicionar soporte de sacarosa y estabilizador de glicina, ajustando pH; con lo cual el producto queda listo para la liofilización.
9. Se esteriliza el producto mediante filtración a través de membranas de 0.8, 0.45 y 0.22 micras, quedando en el producto únicamente los oligopéptidos con la actividad biológica.
10. Control del proceso, muestreando la solución para pruebas de esterilidad. El producto es un preparado en condiciones de esteridad.
11. Se introduce el material necesario para envase (una unidad, que es el producto objetido de un paquete de sangre de 450 ml). Para esto se debe de contar con una jeringa llenadora, frasco, tapón tipo ventana estéril. Este paso es preparatorio al envasado.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION:

Se trata de un método que comprende el fraccionamiento con alto rendimiento para la purificación de los oligopéptidos contenidos en el extracto de leucocitos, cuyos pesos moleculares van de los 1,000 a los 10,000 daltones y su formulación farmacéutica para uso inyectable. Este método consiste en :

1. Separación de la fracción, contenida en una unidad de sangre total (450 ml=, de donadores sanos (VIH, hepatitis y VDRL NEGATIVOS).
102. Se rompen las células, obteniéndose un lisado celular.
3. Una vez rotos los leucocitos, el lisado celular se vacía bajo condiciones asépticas en garrafones, ajustando volúmenes y obteniendo una suspensión del lisado celular, en un volumen conocido.
- 15
4. Clarificación de la suspensión por ultracentrifugación. Mediante centrifugación a una velocidad de 25000 rpm y con un flujo continuo de 10-15 lts/hora, se eliminan con esto detritus celulares del producto.
205. Se somete este material a filtración, mediante el uso de placas de celulosa y prefiltros de Hyflow-supercell; con lo cual se elimina el color y probables endotoxinas bacterianas.

congresos, dos nacionales y uno internacional. Los buenos resultados presentados en dichos eventos son similares a los obtenidos con el extracto leucocitario obtenido por el método de diálisis, lo que permite asegurar la calidad de este con la ventaja de poderse administrar con un mínimo de molestias.

12. Se conecta en forma estéril la salida del sifón del garrafón a la entrada de la llenadora, procediéndose a llenar dentro de la campana de flujo laminar, 1 ml por frasco, que corresponde al volumen ajustado final de una unidad de Factor de Transferencia.

5

13. Liofilización, la cual permite obtener el producto final en la forma de una pastilla seca de fácil solubilidad en agua.

14. Engargolado y marbeteado; asegura las condiciones de pureza y esterilidad del
10 producto mientras esté almacenado hasta su uso.

15. Pruebas biológicas y fisicoquímicas (de seguridad, esterilidad, pirógenos, pH, solubilidad, proteínas, hermeticidad) del lote, requisito necesario para la liberación del producto para su uso.

15

Como ejemplos de operación del proceso podemos citar todos aquellos procesos de fraccionamiento, usados en la obtención de gammaglobulina humana, albúmina, Factor VIII, Factor IX y antitrombina III.

20 El extracto dializable leucocitario obtenido con la metodología antes descrita, fue sometido a pruebas de actividad en pacientes voluntarios, lo que permitió utilizarlo en cinco protocolos de investigación clínica desarrollados en diversas unidades médicas; los resultados de algunos de estos trabajos ya han sido presentados en tres

de alta velocidad y flujo continuo de 12 L/hora, con lo que da mayor actividad del rendimiento, al eliminar remanentes no cuantificables del producto.

3. Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de la sección que contiene los
5 oligopéptidos presentes en el extracto de leucocitos, con pesos moleculares que van de los 1,000 a los 10,000 daltones, y su formulación farmacéutica para uso inyectable, de conformidad con la cláusula 1; caracterizado por que el empleo de placas de acetato de celulosa permite la eliminación de color y de toxinas bacterianas.

10

4. Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de la sección que contiene los oligopéptidos presentes en extracto de leucocitos, con pesos moleculares que van de los 1,000 a los 10,000 daltones, y su formulación farmacéutica para uso inyectable, de conformidad con cláusula 1; caracterizado porque la purificación de
15 los oligopéptidos con actividad biológica es por peso molecular mediante el uso de diafiltración con cassette de corte por peso molecular.

Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de la sección que contiene los oligopéptidos presentes en el extracto de leucocitos, con pesos moleculares que
20 van de los 1,000 a los 10,000 daltones, y su formulación farmacéutica para uso inyectable, de conformidad con la cláusula 1; caracterizado porque la concentración del producto es mediante ultrafiltración tangencial con cassette de 1 kD de corte,

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito la invención, se considera como una novedad, por lo tanto, se reclama el contenido de las siguientes cláusulas:

- 5 1. Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de la sección que contiene los oligopéptidos presentes en el extracto de leucocitos, con pesos moleculares que van de los 1,000 a los 10,000 daltones y su formulación farmacéutica para uso inyectable, mediante un proceso de clarificación por ultracentrifugación, obteniendo mayor actividad de rendimiento, eliminación de color y de endotoxinas bacterianas
10 mediante el uso de placas de celulosa, purificación peso molecular de los oligopéptidos antes mencionados, es decir, los poseedores de la actividad biológica del producto, mediante diafiltración y concentración del producto mediante ultrafiltración tangencial, lo que facilita el proceso de liofilización del producto previamente formulado con el soporte y el estabilizador, a base de glicina y
15 sacarosa, y finalmente, esterilizado por filtración con membrana de 0.22 micras, liofilizado y formulado para uso inyectable.
2. Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de la sección que contiene los oligopéptidos presentes en el extracto de leucocitos, con pesos moleculares
20 que van de los 1,000 a los 10,000 daltones, y su presentación farmacéutica para uso inyectable, de conformidad con la cláusula 1; caracterizado por que la clarificación del extracto es mediante ultracentrifugación, empleando centrifugación

que permite eliminar el volumen de agua 25 veces y llevarlo de 50 ml a 2 ml; lo que facilita el proceso de liofilización del producto.

5. Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de la sección que contiene los oligopéptidos presentes en el extracto de leucocitos, con pesos moleculares que van de los 1,000 a los 10,000 daltones, y su formulación farmacéutica para uso inyectable, de conformidad con la cláusula 1; caracterizado porque la formulación del soporte del producto es a base de glicina y sacarosa, sobre el cual el producto se liofilizará.
6. Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de la sección que contiene los oligopéptidos presentes en el extracto de leucocitos, con pesos moleculares que van de los 1,000 a los 10,000 daltones, y su formulación farmacéutica para uso inyectable, de conformidad con la cláusula 1; caracterizado porque la esterilización del producto es mediante filtración estéril, a través de membrana de 0.22 micras.
7. Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de la sección que contiene los oligopéptidos presentes en el extracto de leucocitos, con pesos moleculares que van de los 1,000 a los 10,000 daltones, y su formulación farmacéutica para uso inyectable, de conformidad con la cláusula 1; caracterizado porque con la liofilización del producto estéril, se da la presentación farmacéutica.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/MX 96/00018

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶ C07K14/52 C07K1/34 A61K38/19

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶ C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DD 301781 A (CYTO CHEMIA BIOLOGISCH-PHARMAZEUTISCHE PRÄPARATE GMBH) 1993 examples 1,2	1-7
A	WO 9200087 A (NAT JEWISH CENTER FOR IMMUNOLO) 09.01.92 See the whole document	1-7
A	CH 656068 A (BEZIRKSBLUTSPENDEZENTRALE PLAUE) 13.06.86 Claims 1,2 Page 3, column 2, line 43 - line 50 Examples 1,2	1-7
A	EP 0010738 A (BENZON AS ALFRED) 14.05.80 Page 6 - page 8	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 February 1997 (25.02.97)

Date of mailing of the international search report

5 March 1997 (05.03.97)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ MX 96/00018

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
DD 301781 A	15.09.94	NINGUNO	
WO 9200087 A	09.01.92	AU 8107191 A	23.01.92
		AU 657915 A	30.03.95
		AU 8195791 A	23.01.92
		CA 2086610 A	03.01.92
		EP 0537280 A	21.04.93
		WO 9200093 A	09.01.92
		US 5470835 A	28.11.95
CH 656068 A	13.06.86	NINGUNO	
EP 0010738 A	14.05.80	WO 8000790 A	01.05.80
		JP 56500015 T	08.01.81

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/MX 96/00018

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD CIP⁶ C07K14/52 C07K1/34 A61K38/19

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁶ C07K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de los pasajes relevantes	N° de las reivindicaciones a que se refieren
A	DD 301781 A (CYTO CHEMIA BIOLOGISCH-PHARMAZEUTISCHE PRÄPARATE GMBH) 1993 ejemplos 1,2	1-7
A	WO 9200087 A (NAT JEWISH CENTER FOR IMMUNOLO) 09.01.92 el documento completo	1-7
A	CH 656068 A (BEZIRKSBLUTSPENDEZENTRALE PLAÜ) 13.06.86 reivindicaciones 1,2 página 3, columna 2, línea 43 - línea 50 ejemplos 1,2	1-7
A	EP 0010738 A (BENZON AS ALFRED) 14.05.80 página 6 - página 8	1-7

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" documentos anterior publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"Z" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
25 Febrero 1997 (25.02.97)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
5 MAR 1997 0 5. 03. 97

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 1 3495304

Funcionario autorizado
M. NOVOA SANJURJO
n° de teléfono +34 1 3495552

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Office

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY

(51) International Patents Classification ⁶ CO7K 14/52, 1/34, A61K 38/19	A1	(11) Number of International Publication WO 97/12915 (43) Date of International Publication: April 10, 1997 (04.10.97)
--	----	---

(21) International Application: PCT/MX96/00018 (22) Date of International Presentation: October 2, 1996 (10.02.96) (23) Data Relative to Priority: 954215 October 5, 1995 MX (10.05.95) (71) Applicant: <i>(for all designated States except US)</i> : INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL (MX/MX): Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", Avenida Luis Enrique Erro, Colonia Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, México, D.F. 07738 (MX) (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants <i>(only US)</i> : ESTRADA PARRA, Sergio Antonio [MX/MX], Prolongación Carpio y Plan de Ayala, Colonia Plutarco Elías Calles, Delegación Miguel Hidalgo, Mexico, D.F. 11340 (MX). PEREZ MORA, Carlos Adolfo [MX/MX], Prolongación Carpio y Plan de Ayala, Colonia Plutarco Elías Calles, Delegación Miguel Hidalgo, México, D.F. 11340 (MX).	(74) Mandatary: OSORNIO CORRES, Francisco Javier, Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", Avenida Luis Enrique Erro, Colonia Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, México, D.F. 07738 (MX). (81) Designated States: AT, AU, BR, CA, CH, CN, DE, ES, GB, JP, KP, RU, US, VN, European Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR IE, IT, LU, MC, NI, PT, SE). Published: With international search report. Before the expiry of the term provided for modification of claims, it will be published again if such claims are received.
---	--

(54) Title: PROCESS FOR PURIFYING THE TRANSFER FACTOR FROM LEUCOCYTES

(57) Abstract:

Process for the purification of the transfer factor (oligopeptides from 1000 to 10000 Daltons, which have biological activity) from leucocytes, comprising the following steps: the cells are lysed in sterile conditions, the suspension is clarified through ultrafiltration, the transfer factor is recovered by diafiltration and concentrated by tangential ultrafiltration. The transfer factor is used pharmaceutically as an immune response regulator.

PROCESS FOR PURIFYING THE TRANSFER FACTOR FROM LEUCOCYTES

BACKGROUND TO THE INVENTION

In 1955, Lawrence described the Transfer Factor in a leukocyte extract obtained by means of dialysis. Although he could not isolate it as a pure product, as the extract contained a large quantity of small biomolecules with some biological activity, he could establish the property of transferring the immunological experience of a donor in the presence of a particular antigen to a receptor who had not been in previous contact with the antigen. The author used as an experimental model the response of the intradermoreaction to PPD, in which negative subjects to the test responded, that is to say, they became positive. This biological activity was obtained from products with a molecular weight of less than 10 kda, which was obtained thanks to the dialysis technique. Despite the time transpired to this day, this method continues being used by different researchers, perhaps because their purposes are centered on the investigation of the effects of the dialyzable extract on the immune response in different ailments in studies in statistically representative populations. However, some authors, including Lawrence in 1956, Baram and Mosko in 1962, Baram in 1966, Gottlieb in 1973 attempted to purify it by low-pressure liquid chromatography, electrophoresis and enzymatic methods and managed to have the leukocyte dialyzable extract possess a peptide fraction and a fraction corresponding to a nucleic acid. Burger in 1979, thanks to this wealth of information and his own work, proposes a rather approximate molecular model.

Vandenbark et al, in 1977, used chromatograph filtration in gel together with an isoelectro approach and HPLC and managed to partially purify the oligopeptides of the dialysis of lysed human leucocytes. Based on these experiments and on the work of Burger, who used different proteolytic enzymes in experiments of sensitivity to the attack of these, proposed a molecular structure consisting of a peptidic component, which is associated to an oligonucleotid that possesses a free hydroxyl group at the extreme 3', through a phosphodiester link. Kirkpatrick and Rozzo, in 1992, publish in Molecular Immunology a method for the purification of the leukocyte dialyzable extract, using a combination of affinity chromatography, reverse phase and HPLC, obtaining the product that was studied in polyacrilamide gel and SDS electrophoresis, chromatographic methods and, most importantly, proving its biological activity.

The method commonly used for the obtainment of the Leukocyte Extract is by means of pocket dialysis. This method is only practical for the production of small batches of leukocyte extract units. Another limiting factor is that the management of the dialysis pockets is an open system, easy to contaminate, and can therefore cause pyrogen problems.

Background to Other Patents

Another method of obtaining this extract is described by Kirkpatrick and Rozzo, which is based on the combination of affinity chromatography, reverse phase and HPLC, and was patented (1991). Goust and Moulias patented a method of production of the

products of the leukocyte extract from the stimulation in vitro of lymphoblastoid cellular lines (1977). Warren patented a pharmaceutical presentation based on a preparation in cream for local use (1982).

The new methodology developed by us makes it possible to handle large volumes in closed system, which makes it possible to produce large batches with the risk of contamination and to reduce the final volume, obtaining an injectable preparation for use in humans, with observance of the strictest quality standards and complying with good manufacturing practices. The method is a system that consists of successive steps of dialyfiltration and tangential filtration from ultracentrifugation for clarification of the raw material. This continuous flow-type methodology could be used in the production of biological hemoderivatives on an industrial scale.

Up to before the development of the methodology used by us, the use of the leukocyte dialyzable extract had the inconvenience that the product obtained was handled with large volumes of liquid, which could range from 10 to 20 ml because an inconvenience in obtaining the extract by means of dialysis is the low yield of the product, which finally leads to handling large volumes. This was a serious problem as the administration route was in intradermal injections and the dose had to be applied distributed in different sites, causing discomfort to the patient. The above has been the experience of different researchers, including our group. For this reason it was very important to develop a high-yield methodology that would allow for obtainment of the product in low volumes, thanks to the elimination of the excess of water.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

It is a method that comprises fractioning with high yield for the purification of the oligopeptides contained in an extract of leukocytes, whose molecular weights range from 1000 to 10000 Daltons and its pharmaceutical formulation for injectable use. This method consists of:

1. Separation of the fraction contained in a unit of total blood (450 ml = from healthy donors (NEGATIVE HIV, hepatitis and VDRL).
2. The cells are broken, obtaining a cellular lysate.
3. Once the leucocytes have been broken, the cellular lysate is emptied in aseptic conditions into demijohns, adjusting volumes and obtaining a suspension of the cellular lysate in a known volume.
4. Clarification of the suspension by ultracentrifugation. By means of centrifugation at a speed of 25000 rpm and a continuous flow of 10-15 L/hour, the cellular detritus of the product are eliminated.
5. This material is subjected to filtration through the use of cellulose plates and Hyflow-Supercell prefilters, with which color and probable bacterial endotoxins are eliminated.
6. Diafiltration through 10 Kd cut cassette, which allows retaining the fraction with biological activity of the product.

7. Concentration by means of tangential filtration or ultrafiltration with 1 Kd cut cassette, eliminating large volumes of water and the sample remaining concentrated.
8. Formulation, which consists of adding saccharose support and glycine stabilizer, adjusting the pH, with which the product is ready for lyophilization.
9. The product is sterilized by filtration through 0.8, 0.45 and 0.22 micra membranes, there remaining in the product only the oligopeptides with biological activity.
10. Control of the process, sampling the solution for sterility tests. The product is a preparation in sterile conditions.
11. The necessary material for bottling (one unit, which is the product obtained from a packet of blood of 450 ml) is introduced. For this, there must be a filler syringe, bottle, sterile window type stopper. This step is preparatory to bottling.
12. The demijohn siphon outlet is connected in sterile form to the entrance of the filler, proceeding to fill the laminar flow jar, 1 ml per bottle, which corresponds to the final adjusted volume of a unit of Transfer Factor.
13. Lyophilization, which permits obtaining the final product in the form of a dry pill easily soluble in water.
14. **Bottling up** and labeling. Assures conditions of purity and sterility of the product while is in storage until use.
15. Biological and physico-chemical tests (safety, sterility, pyrogens, pH, solubility, proteins, airtightness) of the batch, a requisite necessary for liberation of the product for use.

As examples of operation of the process, we can mention all those fractioning processes used in the obtainment of human gamma globulin, albumin, Factor VIII, Factor IX and antithrombin III.

The leukocyte dialyzable extract obtained with the methodology described above was subjected to tests of activity in voluntary patients, which allowed using it in five clinical research protocols developed in different medical units. The results of some of these works have been presented in three congresses, two national and one international. The good results presented at these events are similar to those obtained with the leukocyte extract obtained by means of the dialysis method, which makes it possible to assure its quality, with the advantage of being able to administer it with a minimum of discomfort.

CLAIMS

Having described the invention, we consider it new and therefore claim the contents of the following clauses:

1. Improved procedure for the fractioning of the section that contains oligopeptides present in the leukocyte extract, with molecular weights that range from 1000 to 10000

Daltons, and its pharmaceutical formulation for injectable use, through a process of clarification by ultracentrifugation, obtaining greater yield activity, elimination of color and bacterial endotoxins through the use of cellulose plates, purification, molecular weight of the oligopeptides above mentioned, that is to say, the possessors of the biological activity of the product, by means of diafiltration and concentration of the product through tangential ultrafiltration, which facilitates the process of lyophilization of the product previously formulated with the support and the stabilizer on the basis of glycine and saccharose, and finally sterilized by filtration with membrane of 0.22 micras, lyophilized and formulated for injectable use.

2. Improved procedure for the fractioning of the section that contains the oligopeptides present in the leukocyte extract, with molecular weights ranging from 1000 to 10000 Daltons, and its pharmaceutical preparation for injectable use, according to clause 1, characterized because the clarification of the extract is by means of ultracentrifugation, employing high-speed centrifugation and continuous flow of 12 L/hour, with which there is more activity of the yield by eliminating non-quantifiable remnants of the product.

3. Improved procedure for the fractioning of the section that contains the oligopeptides present in the leukocyte extract, with molecular weights ranging from 1000 to 10000 Daltons, and its pharmaceutical formulation for injectable use, according to clause 1, characterized because the use of cellulose acetate plates permits the elimination of color and bacterial toxins.

4. Improved procedure for the fractioning of the section that contains the oligopeptides present in leukocyte extract, with molecular weights ranging from 1000 to 10000 Daltons, and its pharmaceutical formulation for injectable use, according to clause 1, characterized because the purification of the oligopeptides with biological activity is by molecular weight through the use of diafiltration with cut cassette by molecular weight.

Improved procedure for the fractioning of the section that contains the oligopeptides present in the leukocyte extract, with molecular weights ranging from 1000 to 10000 Daltons, and its pharmaceutical formulation for injectable use, according to clause 1, characterized because the concentration of the product is by means of tangential ultrafiltration with 1kD cut cassette, which permits eliminating the volume of water 25 times and taking it from 50 ml to 2 ml, which facilitates the process of lyophilization of the product.

5. Improved procedure for the fractioning of the section that contains the oligopeptides present in the leukocyte extract, with molecular weights ranging from 1000 to 10000 Daltons, and its pharmaceutical formulation for injectable use, according to clause 1, characterized because the formulation of the support of the product is on the basis of glycine and saccharose, on which the product will be lyophilized.

6. Improved procedure for the fractioning of the section that contains the oligopeptides present in the leukocyte extract, with molecular weights that range from 1000 to 10000 Daltons, and its pharmaceutical formulation for injectable use, according to clause 1, characterized because the sterilization of the product is by means of sterile filtration through membrane of 0.22 micras.

7. Improved procedure for the fractioning of the section that contains the oligopeptides present in the leucocyte extract, with molecular weights ranging from 1000 to 10000 daltons, and its pharmaceutical formulation for injectable use, according to clause 1, characterized because with the lyophilization of the sterile product the pharmaceutical presentation is produced.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

THIS DOCUMENT IS IN ENGLISH AND THERE IS NO NEED FOR
TRANSLATION.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/MX 96/00018

Patent document mentioned in the search report	Date of publication	Member(s) of the family of patents	Date of publication
--	---------------------	---------------------------------------	---------------------

DD 301781A	09.15.94	NONE	
WO 9200087 A	01.09.92	AU 8107191 A	01.23.92
		AU 657915 A	03.30.95
		AU 8195791 A	01.23.92
		CA 2086610 A	01.03.92
		EP 0537280 A	04.21.93
		WO 9200093 A	01.09.92
		US 5470835 A	11.28.95
CH 656068A	06.13.86	NONE	
EP 0010738 A	05.14.80	WO 8000790 A	05.01.80
		JP 56500015 T	01.08.81

Form PCT/SA/210 (annex-families of patents) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

THIS PAGE IS IN SPANISH BUT IS AN EXACT REPLICA IN SPANISH OF
THE DOCUMENT "INTERNATIONAL SEARCH REPORT" WHICH IS
MENTIONED AT PAGE 7.